



Physical interaction between hepatitis c virus ns4b protein and creb-rp/atf6b

童, 文燕

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2831

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002831>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 1 7 】

氏 名 ・(本 籍) 童 文 燕 (中 国)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1512号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

Physical Interaction between Hepatitis C Virus NS4B Protein and
CREB-RP/ATF6 β
(C型肝炎ウイルス NS4B 蛋白と転写因子CREB-RP/ATF6 β の
相互作用の解析)

審 査 委 員

主 査 教 授 堀 田 博

教 授 山 村 博 平

教 授 前 田 盛

<緒言>

C型肝炎ウイルス(HCV)はフラビウイルス科に分類され、急性および慢性肝炎、肝硬変、原発性肝細胞癌の発症に関連することで知られている。HCVは6つの主要な遺伝子型に分けられ、さらに各遺伝子型はそれぞれ数種類のサブタイプに分類される(例えば、HCV-1a、HCV-1b、HCV-1cなど)。サブタイプの違いにより、肝病原性やインターフェロン感受性が異なる。HCVのウイルス遺伝子は約9.6 kbのプラス鎖1本鎖RNAで、大きなopen reading frame (ORF)を持ち、約3,000のアミノ酸残基からなるポリプロテインをコードしている。ポリプロテインは、宿主細胞のシグナルペプチダーゼおよびウイルスがコードする2種類のプロテアーゼによって切断され、少なくとも10種類のウイルス蛋白(C、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)を生じる。

NS4Bは分子量約27 kDaの疎水性蛋白であり、細胞質内の特に核周辺に局在する小胞体(ER)膜蛋白である。NS4BはHCVの他の非構造蛋白と共局在し、NS4Aと安定複合体を形成することが知られている。また、NS4BはNF- κ B、Ap-1やSRE関連転写因子へのintracellular signaling pathwaysを促進するとの報告がある。他に、NIH3T3マウス線維芽細胞にNS4BとH-ras癌遺伝子を共発現させると、H-ras癌遺伝子の悪性形質転換能を促進する事が報告されている。しかしながら、これら以外には、NS4Bと宿主細胞蛋白質の関連はほとんど明らかにされていない。

本研究で、我々は、yeast two-hybrid法を用いてヒトのcDNAライブラリーをスクリーニングし、NS4Bと結合する宿主蛋白を探索した。その結果、転写因子CREB-RP/ATF6 β がNS4Bと直接結合することを明らかにした。また、類縁分子である小胞体ストレス関連の転写因子ATF6 α とも弱く結合することも分かった。

<材料と方法>

(1) 発現プラスミドの構築:

HCV-1bサブタイプに属するM094AJ株のNS4B全領域(aa 1-261)、及びその欠失変異体をLexA DNA結合領域を有する酵母内発現ベクターpHybLex/Zeoまたは哺乳動物細胞内発現ベクターpcDNA3.1(-)にそれぞれ組み込み、pHybLex/Zeo-NS4BとpcDNA3.1/NS4Bを作成した。また、全長CREB-RP/ATF6 β のコーディング領域をFLAGタグ付加pcDNA3.1(+)

発現ベクターに組み込み、pcDNA3.1/N-FLAG-CREB-RP/ATF6 β を作成した。ATF6 α (aa 294-409)をpYESTrp-2発現ベクターに組み込み、pYESTrp-2-ATF6 α を作成した。

(2) Yeast two-hybrid 法:

Hybrid Hunter (Invitrogen 社)を用いて、NS4B全領域およびその欠失変異体をbaitとし、HeLa細胞cDNAライブラリー (Invitrogen 社)をpreyとして、プロトコールに従い yeast two-hybrid アッセイを行った。YC-WHHUKZ300 栄養欠損培地で増殖し、かつ β -galactosidase (β -Gal)活性を有する酵母クローンからDNAを回収し、*Escherichia coli* (HB101)にトランスフェクトしてプラスミドDNAを回収し、その塩基配列を調べた。

(3) 細胞培養と蛋白発現:

ワクシニアウイルス感染HeLa細胞にpcDNA3.1/NS4BとpcDNA3.1/N-FLAG-CREB-RP/ATF6 β をトランスフェクトし、一過性に発現させた。両蛋白質の細胞内共局在と複合体形成を蛍光抗体法および免疫共沈法で検討した。

(4) 二重染色蛍光抗体法:

一過性発現細胞を2%パラホルムアルデヒド処理し、メタノール固定した後、NS4Bに強く反応する患者血清および抗FLAGマウスモノクローナル抗体を反応させ、FITC標識抗ヒトIgGおよびTexas Red標識抗マウスIgGで二重染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

(5) 免疫共沈法:

一過性発現細胞の溶解液と抗FLAGマウスモノクローナル抗体を反応させ、抗原抗体複合体をprotein G-sepharoseを用いて回収した。回収した試料をSDS-PAGEにより電気泳動し、PVDF膜に転写後、NS4B蛋白に強く反応する患者血清を用いてウエスタンブロット法により解析した。二次抗体として抗ヒトIgG抗体を反応させ、ECL法で目的とする蛋白バンドを検出した。

<結果>

(1) NS4B結合蛋白としてのCREB-RP/ATF6 β の同定:

HCV NS4Bの全領域をbaitとして用いた yeast two-hybrid 法で、 2×10^6 個の酵母トランスフォーマントをスクリーニングし、CREB-RP/ATF6 β の一部(aa 314-428)(bZIPを含む)をコードする遺伝子断片を単離した。

種々のNS4B欠失変異体をそれぞれCREB-RP/ATF6 β の一部(aa 314-

428) と共発現させると、NS4B (aa 1-195) と NS4B (aa 1-133) は、全長 NS4B とほぼ同程度に、CREB-RP/ATF6 β と結合した。一方、NS4B (aa 15-133) や NS4B (aa 41-133) と CREB-RP/ATF6 β の結合は、全長 NS4B と比べると弱く、NS4B (aa 1-63) と NS4B (aa 133-261) では、CREB-RP/ATF6 β との結合は全く認められなかった。以上の成績より、NS4B の N 末端部分 (aa 1-133) が結合責任領域と同定された。

(2) 哺乳動物細胞における NS4B と CREB-RP/ATF6 β の結合と共局在：

HeLa 細胞に両蛋白を共発現させた後、FLAG 抗体、あるいは陰性対照としての抗 p21/Waf1 抗体をそれぞれ反応させ、免疫共沈法により解析した。その結果、HeLa 細胞においても NS4B と CREB-RP/ATF6 β が結合することが明らかになった。また、二重染色蛍光抗体法で、全長 NS4B と全長 CREB-RP/ATF6 β はともに細胞質内にみられ、両者の細胞内局在が部分的に一致した。以上の結果、NS4B と CREB-RP/ATF6 β は哺乳動物細胞でも相互作用することが明らかとなった。

(3) NS4B と ATF6 α の結合：

ATF6 α (aa 294-409) は CREB-RP/ATF6 β (aa 314-428) のアミノ酸配列と高いホモロジー (50%) を示すことが知られている。yeast two-hybrid 法により ATF6 α (aa 294-409) は NS4B と結合することが分かった。その結合力は CREB-RP/ATF6 β の場合に比べると、弱い傾向がみられた。

<考察>

我々は yeast two-hybrid 法を用いて、NS4B と結合する宿主細胞蛋白 CREB-RP/ATF6 β を単離し、両蛋白の結合責任領域を同定した。NS4B (aa 1-133) は、全長 NS4B と同程度の強さで CREB-RP/ATF6 β と結合した。一方、NS4B の N 末端 14 aa を欠失させた変異体 (aa 15-133) では、その結合が減弱した、また、NS4B の N 末端 63aa (aa 1-63) だけでは、CREB-RP/ATF6 β と全く結合しなかった。以上の成績より、NS4B の結合責任領域は N 末端 (aa 1-133) であることが分かった。NS4B は N 末端の aa 1-46 が細胞質に存在し、aa 47-64、aa 69-86、aa 91-108、aa 113-133 と aa 138-155 の 5 カ所が膜貫通領域であると報告されている。我々の結果より、CREB-RP/ATF6 β と完全に結合するために、NS4B の N 末端の 5 つの膜貫通領域のうち、最初の 1 カ所だけではなく 4 カ所の膜貫通領域が必要であると考えられる。一方、CREB-RP/ATF6 β の NS4B 結合責任領域は bZIP 領域を含む領域 (aa 313-428) であることが分かった。さらに、哺乳動物細胞における両蛋白質の結合も免疫共沈法により確認

した。yeast two-hybrid の場合と同様に、NS4B の N 末端 40 残基以上の欠失変異体はすべて、CREB-RP/ATF6 β との結合が損なわれることが判った。両者の小胞体膜での局在が部分的に一致することが共焦点レーザー顕微鏡法により確認された。以上の成績より、酵母、哺乳動物細胞いずれにおいても、NS4B と CREB-RP/ATF6 β が結合することが明らかになった。

我々は、NIH3T3 細胞を用いて全長 NS4B 発現細胞株を作製し、NS4B が細胞機能に及ぼす影響についても調べた。FACSscan により NS4B 発現細胞株は対照細胞株に比べて核の propidium iodide (PI) 染色性が有意に増加していた。CREB-RP/ATF6 β 類似の転写因子である CREB や他の ATF β s はヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を修飾して染色体構造のリモデリングを引き起こし、転写因子が染色体 DNA に結合しやすくなることが知られている。NS4B 発現細胞株における核の PI 染色性の増加は、同様の機序による可能性が考えられる。

CREB-RP/ATF6 β は bZIP superfamily のひとつである CREB/ATF subfamily に属し、ATF6 α と高いホモロジーを有する。CREB-RP/ATF6 β は小胞体ストレスで誘導される遺伝子の転写を抑制するが、ATF6 α は逆に促進することが報告されている。小胞体ストレス応答の結果、CREB-RP/ATF6 β と ATF6 α は細胞のペプチダーゼによって切断され、bZIP を含む N 末端 (それぞれ aa 1-392 と aa 1-373) が核内へ移行する。従って、NS4B は、小胞体ストレス存在下で、CREB-RP/ATF6 β や ATF6 α の転写抑制または促進の機能に何らかの影響を及ぼすと考えられる。さらに、NS4B は細胞株や小胞体ストレスの違いにより、CREB-RP/ATF6 β と ATF6 α に種々の異なる影響を与える可能性も考えられる。一方、HCV の複製によって ATF6 α が活性化すると報告があるが、本研究で我々が明らかにした NS4B と CREB-RP/ATF6 β あるいは ATF6 α との相互作用との関連は今後の検討課題である。

多くの癌ウイルスは bZIP クラスの転写因子と結合するウイルス蛋白を持っている。たとえば、B 型肝炎ウイルスの HBx 蛋白は bZIP 転写因子と結合する。同じく、HCV コア蛋白は LZIP (bZIP superfamily のひとつ) と結合し、細胞の癌化を促進する。NS4B は H-ras 癌遺伝子の悪性形質転換を促進すると報告もあり、NS4B と CREB-RP/ATF6 β との結合が HCV による発癌に関与している可能性も考えられる。NS4B と CREB-RP/ATF6 β の相互作用について、今後の更なる研究が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1505 号	氏 名	童 文 燕
論文題目	Physical Interaction between Hepatitis C Virus NS4B Protein and CREB-RP/ATF6 β C型肝炎ウイルスNS4B蛋白と転写因子 CREB-RP/ATF6 β の相互作用の解析		
審査委員	主 査 堀 田 博 () 副 査 山 村 博 幸 () 副 査 新 田 盛 ()		
審査終了日	平成 15 年 2 月 28 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

<p>C型肝炎ウイルス(HCV)は急性および慢性肝炎、肝硬変、原発性肝細胞癌の原因ウイルスのひとつである。HCV遺伝子は約9.6 kbのプラス鎖1本鎖RNAで、約3,000アミノ酸残基からなるポリプロテインをコードしている。ポリプロテインは、宿主細胞のシグナルペプチダーゼおよびウイルスがコードする2種類のプロテアーゼによって切断され、少なくとも10種類のウイルス蛋白(C、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)を生じる。NS4Bは分子量約27 kDaの疎水性蛋白であり、細胞質内の特に核周辺に局在する小胞体膜蛋白である。NS4BはNS4Aと安定複合体を形成し、HCVの他の非構造蛋白とも共局在する。また、NS4BはNF-κB、Ap-1やSRE関連転写因子への細胞内シグナル伝達を促進するとの報告がある。他に、NS4Bは、NIH3T3マウス線維芽細胞におけるH-ras癌遺伝子の悪性形質転換能を促進する事が報告されている。しかしながら、これら以外には、NS4Bと宿主細胞蛋白質の関連はほとんど明らかにされていない。本研究では、yeast two-hybrid法を用いてヒトcDNAライブラリーをスクリーニングし、NS4Bと結合する宿主蛋白質を探索した。そして、以下のことを明らかにした。</p> <p>1) NS4B結合蛋白としてのCREB-RP/ATF6βの同定：NS4Bの全領域(aa 1-261)をbaitとしたyeast two-hybrid法でヒトcDNAライブラリーをスクリーニングし、ストレス応答性転写因子CREB-RP/ATF6βの一部(aa 314-428)をコードする遺伝子断片を単離した。種々のNS4B欠失変異体を用いた解析では、N末端側半分NS4B(1-133)は全長NS4Bと同程度にCREB-RP/ATF6βと結合するが、N末端14残基を欠失させた変異体NS4B(15-133)ではその結合が大幅に減弱し、N末端63残基からなるNS4B(1-63)はCREB-RP/ATF6βと全く結合しなかった。以上より、CREB-RP/ATF6βとの結合にはNS4BのN末端133残基が必要であると推論した。</p> <p>2) 哺乳動物細胞におけるNS4BとCREB-RP/ATF6βの結合と共局在：HeLa細胞に両蛋白を共発現させ、免疫共沈法により、全長NS4Bと全長CREB-RP/ATF6βが結合することを証明した。N末端40残基を欠失したNS4B(41-261)のCREB-RP/ATF6βとの共沈は有意に減弱し、NS4B(63-261)では全く共沈が認められなかった。NS4BはN末端のaa 1-46が細胞質に存在し、aa 47-64、aa 69-86、aa 91-108、aa 113-133とaa 138-155の</p>

5カ所が膜貫通領域であると報告されている。以上の結果より、CREB-RP/ATF6 β と完全に結合するために、NS4BのN末端の5つの膜貫通領域のうち、最後の1カ所以外の4カ所の膜貫通領域で構成されるコンフォメーションが必要であると考えられた。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いた二重染色蛍光抗体法で、小胞体膜での全長NS4Bと全長CREB-RP/ATF6 β の共局在を証明した。

3) NS4BとATF6 α の結合: ATF6 α (294-409)はCREB-RP/ATF6 β (314-428)のアミノ酸配列と高いホモロジー(50%)を示す。yeast two-hybrid法により、ATF6 α (294-409)はNS4Bとも結合するが、その結合力はCREB-RP/ATF6 β の場合に比べると弱いことがわかった。

CREB-RP/ATF6 β はbZIP superfamilyのひとつであるCREB/ATF subfamilyに属し、ATF6 α と高いホモロジーを有する。CREB-RP/ATF6 β は小胞体ストレスで誘導される遺伝子の転写を抑制するが、ATF6 α は逆に促進することが報告されている。NS4Bは、小胞体ストレス存在下で、CREB-RP/ATF6 β やATF6 α の転写抑制または促進の機能に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。多くの癌ウイルスはbZIPクラスの転写因子と結合するウイルス蛋白質を持っている。たとえば、B型肝炎ウイルスのHBx蛋白はbZIP転写因子と結合し、また、HCVコア蛋白はLZIPと結合し、細胞の癌化を促進する。NS4BとCREB-RP/ATF6 β との結合がHCVによる発癌に関与している可能性も考えられる。これに関連して、申請者は、全長NS4B発現細胞株は対照細胞株に比べて核のpropidium iodide (PI)染色性が有意に増加することを見い出した。CREB-RP/ATF6 β 類似の転写因子であるCREBや他のATFsはヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を修飾して染色体構造のリモデリングを引き起こし、転写因子が染色体DNAに結合しやすくすることが知られている。NS4B発現細胞株における核のPI染色性の増加は、同様の機序が関与している可能性が考えられる。この現象と細胞癌化との関連は興味ある検討課題である。

以上、本研究は、HCV蛋白の構造と機能について調べたものであるが、従来ほとんど行われていなかったNS4BとCREB-RP/ATF6 β との相互作用を証明し、NS4Bが細胞に及ぼす影響を明らかにしたものであり、HCV病原性発現機序について重要な知見を得たも

のとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。